



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(19)

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 181 491
A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 85112725.8

(51) Int. Cl.⁴: **B 01 J 19/24**
//C07H21/00, C07K1/00

(22) Anmeldetag: 08.10.85

(30) Priorität: 18.10.84 CH 4994/84

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
21.05.86 Patentblatt 86/21

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

(71) Anmelder: F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.
Aktiengesellschaft

CH-4002 Basel(CH)

(72) Erfinder: Bannwarth, Wilhelm, Dr.
Liebenbergstrasse 8
D-7888 Rheinfelden-Beuggen.(DE)

(72) Erfinder: laize, Patrick
22 Rue des Maraichers
F-68300 St.Louis(FR)

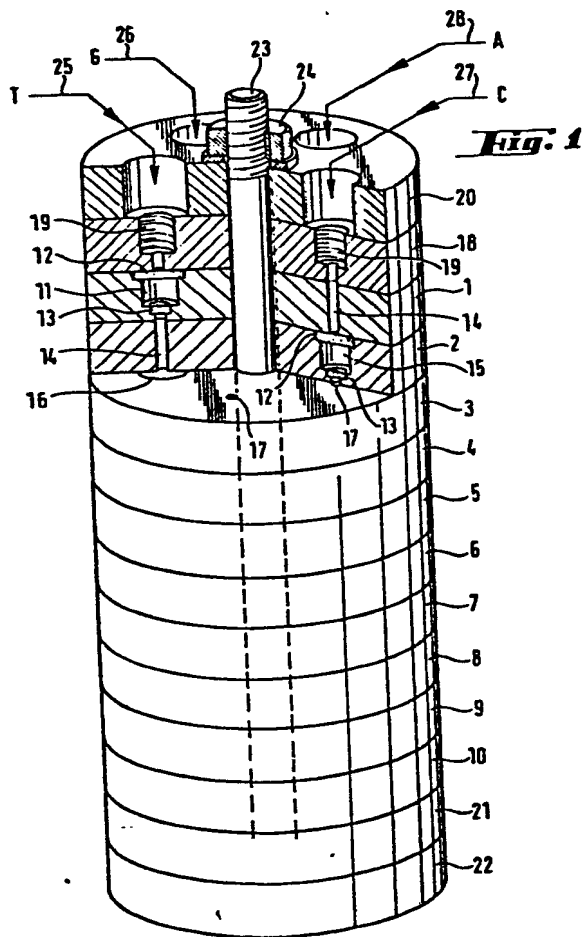
(74) Vertreter: Körber, Wolfhart, Dr. et al,
Patentanwälte Dipl.-Ing. H. Mitscherlich Dipl.-Ing. K.
Gunschmann Dr.rer.nat. W. Körber Dipl.Ing. J.
Schmidt-Evers Dipl.-Ing. W. Melzer Steinsdorfstrasse 10
D-8000 München 22(DE)

(54) Vorrichtung zur parallelen Durchführung einer Vielzahl von chemischen Reaktionssequenzen.

(57) Vorrichtung zur Durchführung chemischer Reaktionssequenzen mit einer ersten Anzahl n von vorzugsweise kreisförmigen Reaktionsscheiben (1), die stapelförmig übereinander angeordnet und individuell gegeneinander verschiebbar sind, Mitteln zur Festlegung der Verschiebung in einer zweiten Anzahl m von gleichen Schritten, m in den Schrittabständen voneinander angeordneten durchgehenden Bohrungen (11, 14) der Scheiben, von denen eine je Scheibe zu einer Reaktionskammer (14) erweitert ist und Mitteln zum Zurückhalten eines Trägermaterials in der Reaktionskammer beim Durchfluss eines Reagens.

EP 0 181 491 A1

./...



RAN 4700/107

5

Vorrichtung zur parallelen Durchführung einer Vielzahl
von chemischen Reaktionssequenzen

10

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Durchführung einer Vielzahl von Reaktionssequenzen. Eine derartige Vorrichtung eignet sich speziell zur Synthese von Polymermoleküle wie Nukleotiden, Proteinen etc. an einem Trägermaterial wie z.B. Glas, Kieselgel oder anderem geeigneten Material.

20

In der Regel geschieht der chemische Aufbau solcher Polymermoleküle in Reaktionskammern (z.B. Fritten, Säulen, etc.) in welchen der erste Baustein der zu synthetisierenden Moleküle an das entsprechende Polymermaterial gebunden vorliegt und die Zudosierung der zur Synthese erforderlichen Reagenzien entweder manuell oder automatisch erfolgen kann.

25

Es liegt in der Natur der Reaktionssequenzen, dass zum Aufbau eines längerkettigen Moleküls verhältnismässig viel Zeit benötigt wird. Benötigt man eine Vielzahl verschiedener, aus den gleichen Bausteinen aufgebaute Polymermoleküle, so ist der Zeitaufwand, bis alle gewünschten Syntheseprodukte vorliegen, oft unerträglich lang. Daraus ergibt sich ein Bedürfnis nach einer Möglichkeit, eine Vielzahl von verschiedenen Polymermolekülen aus gleichen Reagenzien simultan aufzubauen. In diesem Sinne liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung bereitzustellen mit der eine Vielzahl von Reaktionssequenzen simultan durchgeführt werden kann.

35

Erfindungsgemäss wurde dies durch die im Patentanspruch definierte Vorrichtung erreicht.

5 Die Vorrichtung dient speziell zur simultanen
Synthese einer Vielzahl von DNA- und RNA-Segmenten unter-
schiedlicher Kettenlänge und Sequenz an einem polymeren
Trägermaterial. In an sich bekannter Weise werden dabei die
DNA-Segmente aus Mononukleotiden aufgebaut, wobei jedes
beliebige geeignete Trägermaterial, vorzugsweise Glasparti-
10 kel und verschiedene Synthesestrategien, vorzugsweise das
Triester- oder das Phosphit-triester-Verfahren, angewandt
werden können.

15 Nachfolgend wird anhand der beiliegenden Zeichnungen
ein Ausführungsbeispiel der Erfindung beschrieben. Es
zeigen

Fig. 1 eine Vorrichtung mit zehn Reaktionsscheiben
in perspektivischer Ansicht, teilweise aufgeschnitten,

20 Fig. 2 eine Aufsicht auf eine einzelne Reaktions-
scheibe.

Fig. 1 zeigt eine Vorrichtung zur gleichzeitigen
25 Synthese von zehn verschiedenen DNA-Segmenten, wobei als
Träger ein Polymergranulat verwendet wird. Der jeweils
erste Baustein der zu synthetisierenden Ketten befindet
sich vor dem Synthesebeginn bereits auf dem Träger.

30 Die Vorrichtung besteht aus einem Stapel konzentrisch
aufeinanderliegender runder Scheiben, in denen mehrere
Kanalsysteme ausgebildet sind. Die sog. Reaktionsscheiben
1-10 sind den zehn zu synthetisierenden Oligonukleotiden
zugeordnet, d.h. in jeder Reaktionsscheibe wird ein be-
35 stimmtes Oligonukleotid aufgebaut. Zu diesem Zweck weist
beispielsweise die erste Reaktionsscheibe 1 eine Reaktions-
kammer 11 auf. Die Reaktionskammer 11 ist eine etwa halbwegs
zwischen der Achse und dem Rand der Scheibe angeordnete,

sich von der oberen Fläche bis zu etwa dreiviertel der Scheibendicke erstreckende Bohrung. Die Kammer dient zur Aufnahme des Trägergranulats. Am oberen Rand besitzt die Kammer eine umlaufende Verbreiterung zur Aufnahme einer Fritte 12, die die Reaktionskammer 11 nach oben abschliesst. In einer konzentrischen Ausnehmung des Kammerbodens befindet sich eine weitere Fritte 13, die den Abschluss der Kammer 11 nach unten gegenüber einer vom Kammerboden zur Unterfläche der Scheibe führenden, durchgehenden Bohrung mit sehr kleinem Durchmesser, z.B. 1 mm bildet.

Die Reaktionsscheibe 1 weist ausser der Reaktionskammer 11 vier durchgehende Bohrungen 14 von gleichem kleinen Durchmesser von z.B. 1 mm auf. Diese Bohrungen sind gegenüber der Reaktionskammer um jeweils 72° , 144° , 216° und 288° versetzt angeordnet.

Die weiteren Reaktionsscheiben sind in der gleichen Weise aufgebaut. Sie sind individuell gegeneinander um ein zentrales Verbindungselement drehbar.

Die unmittelbar anschliessende Reaktionsscheibe 2 ist in der Zeichnung um 144° gedreht gezeigt, so dass ihre Reaktionskammer 15 coaxial zur Bohrung 14 der ersten Scheibe 1 liegt.

Die nächste Reaktionsscheibe 3, die in der Zeichnung nicht mehr aufgeschnitten gezeigt ist, befindet sich wieder in der Lage, in der ihre Reaktionskammer -erkennbar an der Fritte 16- mit der Reaktionskammer 11 der Scheibe 1 fluchtet. Bei der Scheibe 3 ist eine um 72° versetzte Bohrung 17 erkennbar.

Den Stapel der Reaktionsscheiben 1-10 begrenzen eine obere Anschluss-Scheibe 18 zum Anschluss der Zuführungsschlauchleitungen für die Reagenzien und eine untere Anschluss-Scheibe 21 für den Anschluss der wegführenden Schlauchleitungen. Die obere Anschluss-Scheibe 18 weist

mit den Kanälen bzw. Reaktionskammern in den Reaktions-
scheiben fluchtende Bohrungen 19 mit Gewinden zum Ein-
schrauben der Fittings für die Zuführungsschläuche. Die
sich etwa bis zu dreiviertel der Scheibendicke erstrecken-
5 den Bohrungen 19 setzen sich, ähnlich wie bei den Reaktions-
kammern, in durchgehenden engen Bohrungen bis zur Platten-
unterseite fort. Die untere Anschluss-Scheibe 21 kann der
oberen entweder gleichen oder sie besitzt einen einfachen
Sammelkanal (nicht gezeigt), falls die verbrauchten Reagen-
10 zien nicht mehr getrennt geführt werden müssen.

Die Reaktionsscheiben 1-10 und die Anschlussscheibe
18 weisen auf ihren unteren Flächen die engen Bohrungen
ringförmig umgehende Nuten auf, die zur Aufnahme von
15 O-Ringen dienen, mit denen die Kanäle an den Uebergängen
zwischen den Scheiben abgedichtet werden. Diese Dichtungs-
systeme sind in der Zeichnung zugunsten der Uebersichtlich-
keit weggelassen.

20 Ueber der oberen Anschluss-Scheibe 18 ist eine obere
Anpress-Scheibe 20 angeordnet. Entsprechend befindet sich
unter der unteren Anschluss-Scheibe 21 eine untere Anpress-
Scheibe 22. Diese Anpress-Scheiben 20, 22 übertragen die
Kraft die von einem als zentrales Verbindungselement
25 dienenden Bolzen 23 erzeugt wird, der sich in einer durch
den ganzen Stapel geführten axialen Bohrung befindet und
mit einer Verschraubung (Mutter 24) versehen ist, auf den
Stapel. Durch diese Presskraft werden die Scheiben derart
aufeinandergedrückt, dass absolute Dichtheit der Kanäle
30 gewährleistet ist und ein allfälliger, innerhalb der
Dichtungsringe möglicher Totraum eliminiert wird.

Durch entsprechende Ausrichtung der Reaktionsscheiben
1-10 fluchten ihre Reaktionskammern und Bohrungen so, dass
35 sich im Stapel vier Kanäle ergeben, von denen jetzt jeder
mit einem der Mononukleotide A, T, C oder G beschickt wird
(in der Zeichnung durch Pfeile angedeutet), wodurch die

wachsenden DNA-Stücke simultan um das entsprechende Nukleotid verlängert werden.

Dazu wird die Reaktionskammer 11 von Scheibe 1 jeweils für die entsprechende Zeit in den Kanal gebracht, dessen Nukleotid angelagert werden soll (befindet sich in der Zeichnung im Kanal, in welchem mit T verlängert wird, während sich die Kammer von Scheibe 2 im C-Kanal befindet: hier würde also C in der gleichen Zeit wie bei Scheibe 1 T angelagert werden). Alle für die Anknüpfung der Mononukleotide erforderlichen Reaktionen und Waschprozesse (Schutzgruppenabspaltung, Capping, ggf. Oxidation) finden ebenfalls simultan statt (kontinuierliches Durchflussverfahren). Nach Beendigung eines Anknüpfungszyklus werden die einzelnen Scheiben wieder so verdreht, dass ihre Kammern sich im Kanal des nächsten jeweils anzulagernden Nukleotids befinden. Zum Verdrehen der Scheiben wird die Mutter 24 gelöst und anschliessend wieder angezogen. Ist die Synthese eines DNA-Fragmentes in einer der Scheiben beendet, so wird ihre Kammer in die Leerposition gestellt, wobei die restlichen vier engen Bohrungen der Scheibe die vier Verbindungskanäle für die Verlängerung der DNA-Segmente in den anderen Reaktionsscheiben aufrecht erhalten.

Nach Beendigung der Synthesen aller DNA-Segmente in den einzelnen Reaktionsscheiben wird aus ihnen nach Auseinanderbauen der Vorrichtung und Entfernen der Fritte 12 das Trägermaterial mit den anhaftenden synthetisierten Nukleotidsequenz entfernt. Nach Abspaltung der Schutzgruppen und Loslösen vom Trägermaterial werden die gewünschten ungeschützten DNA-Segmente aus den Rohgemischen mittels einer geeigneten Reinigungsmethode in reiner Form erhalten.

Um die individuelle Drehung der einzelnen Reaktionsscheiben auf die sinnvollen Winkelschritte von 72° zu beschränken, müssen mindestens sichtbare Markierungen ange-

bracht werden. Besser ist allerdings ein Mechanismus der bei der richtigen Winkelstellung ein Einrasten vorsieht.

Die Vorrichtung kann sowohl manuell als auch mechanisch mit geeigneten Antriebsorganen bedient werden.
5 Letztere Betriebsweise kann auch mit einer Programmsteuerung kombiniert werden.

Die vorstehend als Ausführungsbeispiel beschriebene
10 Vorrichtung besteht aus Reaktionsscheiben mit ca. 60 mm Durchmesser und ca. 10 mm Dicke. Die Bohrungen 14 haben, wie bereits erwähnt, einen Durchmesser von ca. 1 mm. Die Reaktionskammern haben einen Durchmesser von ca. 6 mm. Diese Abmessungen haben aber lediglich im Zusammenhang mit
15 einem bestimmten Syntheseprogramm Bedeutung. Vorrichtungen mit gleichem Aufbau- und Funktionsprinzip können in weiten Grenzen wählbare Abmessungen aufweisen und können insbesondere wesentlich grösser sein als das beschriebene Ausführungsbeispiel. Auch die Zahl der Bohrungen pro Scheibe kann
20 grösser sein als bei dem vorstehend beschriebenen Beispiel. Dies ist beispielsweise für Peptidsynthesen wichtig.

Ausserdem ist selbstverständlich auch die Form der Scheiben und speziell der Reaktionskammern in keiner Weise
25 auf das Ausführungsbeispiel beschränkt. So wäre es beispielsweise möglich, anstelle der kreisförmigen Anordnung der Bohrungen auf kreisrunden Scheiben eine lineare Anordnung der Bohrungen und dementsprechend eine lineare Verschiebung der Scheiben anstelle der Verdrehung vorzu
30 sehen.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Durchführung chemischer Reaktionssequenzen gekennzeichnet durch

5

- eine erste Anzahl n von Reaktionsscheiben (1), die stapelförmig übereinander angeordnet und individuell gegeneinander verschiebbar sind,

10

- Mittel zur Festlegung der Verschiebung in einer zweiten Anzahl m von gleichen Schritten,

- m in den Schrittabständen voneinander angeordnete durchgehende Bohrungen (11, 14) der Scheiben, von denen
15 eine je Scheibe zu einer Reaktionskammer (14) erweitert ist,

- Mittel zum Zurückhalten eines Trägermaterials in der Reaktionskammer beim Durchfluss eines Reagenz.

20

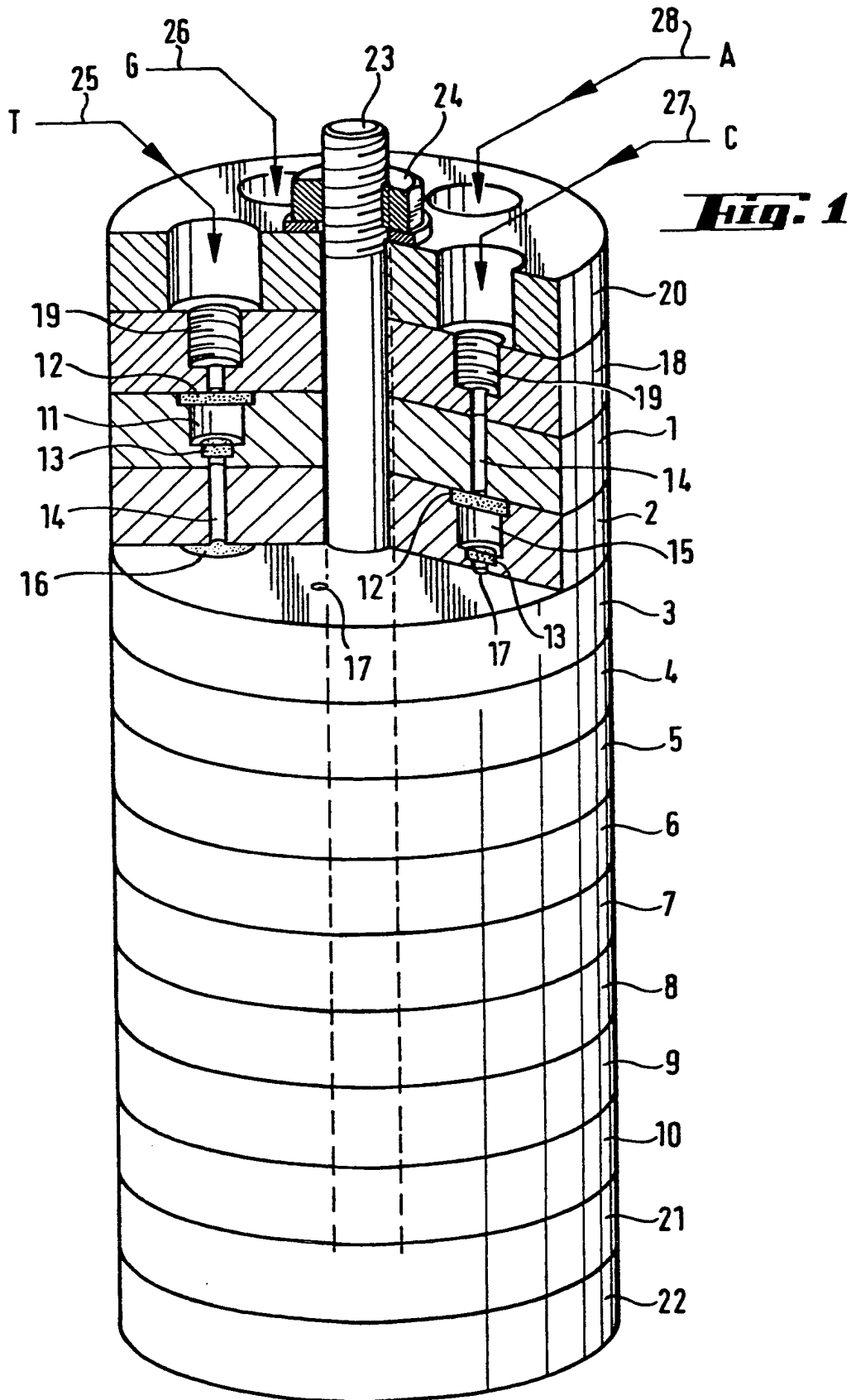
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsscheiben kreisförmig und gegeneinander verdrehbar und die Bohrungen ebenfalls kreisförmig auf ihnen angeordnet sind.

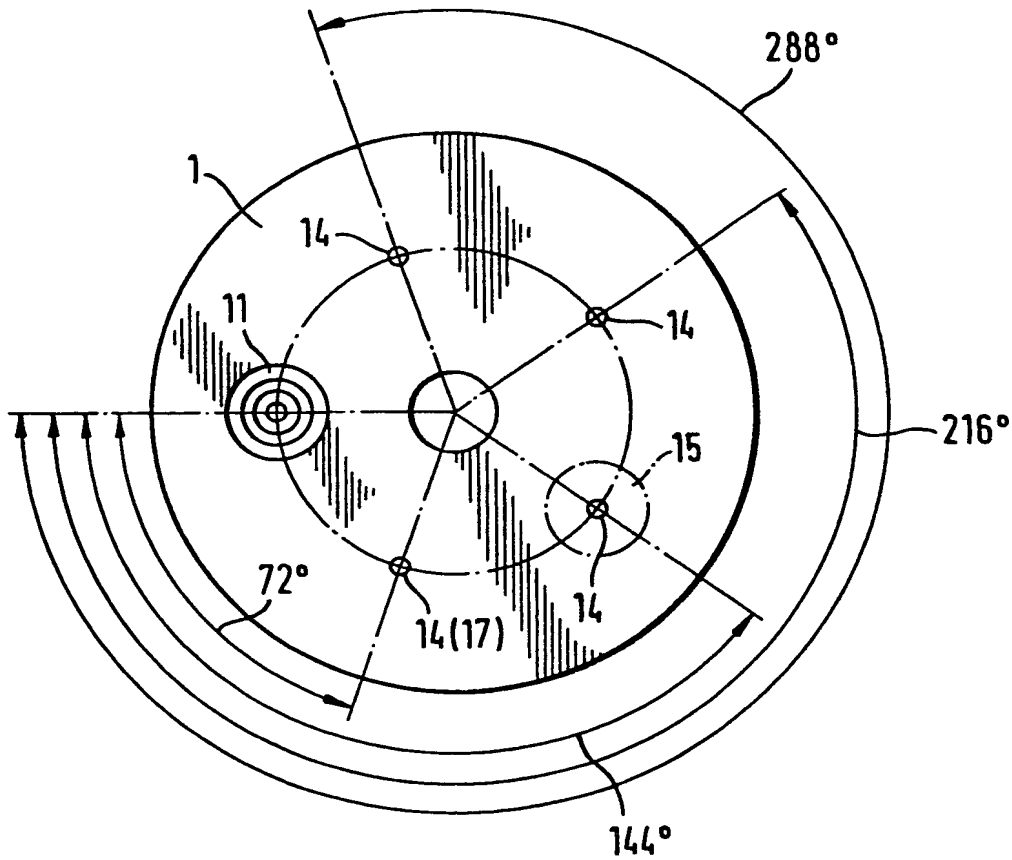
25

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Schrittabstände gleiche Winkelschritte sind.

4. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
30 net, dass die Mittel zum Zurückhalten des Trägermaterials in der Reaktionskammer Fritten sind, die in entsprechenden Ausnehmungen der Reaktionskammer angeordnet sind.

5. Vorrichtung nach einem der vorangehenden Ansprüche,
35 dadurch gekennzeichnet, dass die Unterflächen der Reaktionsscheiben zu den Bohrungen konzentrisch umlaufende Nuten aufweisen, in denen O-Ringe angeordnet sind.



**Fig. 2**



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0181491

Nummer der Anmeldung

EP 85 11 2725

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
A	US-A-3 876 881 (P. BOHLEN) * Auszug; Abbildungen 1,2; Spalte 3, Zeile 44 - Spalte 4, Zeile 57; Spalte 4, Zeile 64 - Spalte 5, Zeile 3 *	1-3	B 01 J 19/24 // C 07 H 21/00 C 07 K 1/00
A	US-A-4 483 964 (M.S. URDEA et al.) * Auszug; Abbildung; Spalte 4, Zeilen 47-53; Spalte 5, Zeilen 42-49 * -----	4	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
			B 01 J C 07 H C 07 K G 01 N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 14-01-1986	
		Prüfer SIEM T.D.	
<div>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</div> <div>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</div> <div>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</div>			

EPA Form 1503 03 87